

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Rencana penelitian yang akan digunakan adalah penelitian secara *in silico*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan di Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Alat dan Bahan Penelitian

4.3.1 Alat Penelitian

4.3.1.1 Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan pada penelitian kali ini berupa PC dengan processor Intel (R) Core (TM) i5-3470M CPU @ 3.20GHz (4 CPUs); Operating system : Windows 7 Ultimate 64-bit (6.1, Build 7601); BIOS Phoenix Secure Core-Tiano(tm) NB Version 2.1 02PR; Memory : 8192 MB RAM.

4.3.1.2 Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini berupa :

1. Autodock *Tools*
2. Biovia Discovery Studio
3. *PubChem*
4. PDB (*Protein Data Bank*)
5. ChemDraw 3D
6. PASW Statistics 18

4.3.2 Bahan Penelitian

4.3.2.1 Kandungan Senyawa dalam Tanaman

Digunakan dua tanaman yang terdapat kandungan senyawa-senyawa kimia dari tanaman yakni *Zingiberis rhizoma* dan *Glycyrrhiza radix*. Struktur kimia kandungan senyawa tumbuhan diperoleh dari PubChem dan penggunaan *software* Avogadro. Untuk senyawa tumbuhan dapat dilihat pada Lampiran III.

Tabel VI.1 Tabel Reseptor Obat Batuk

Obat Batuk		Reseptor
Golongan Obat	Senyawa Obat	
Antitusif	Benzonatate	2WAL
Antihistamin	Diphenhydramine	2AOT
Bronkodilator	Isoprenalin	2Y03

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1 Kriteria Inklusi

1. Kriteria Inklusi Pencarian di PDB
 - a. Nama obat tercantum di PDB
 - b. Nama obat yg tercantum di PDB masuk dalam golongan homo sapiens
 - c. Urutan tatalaksana obat tercantum pada daftar pustaka tertera
2. Kriteria di Inklusi Senyawa Tanaman
 - a. Nama senyawa kandungan tercantum dalam daftar pustaka (jurnal)
 - b. Nama senyawa dapat ditemukan strukturnya di PUBCHEM atau CHEMSPIDER.

4.4.2 Kriteria Eksklusi

1. Kriteria Eksklusi Pencarian di PDB
 - a. Nama obat tidak tercantum di PDB
 - b. Nama obat tidak termasuk dalam golongan homo sapiens
 - c. Nama obat tidak tercantum dalam daftar pustaka
 - d. Reseptor Obat mempunyai RMSD >2
2. Kriteria Eksklusi Senyawa Tanaman
 - a. Nama senyawa kandungan tidak tercantum dalam daftar pustaka
 - b. Nama senyawa tidak dapat ditemukan strukturnya.
 - c. Senyawa tidak dapat di docking karena strukturnya terlalu besar atau kompleks.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Preparasi Senyawa

Pada penelitian ini terdapat masing-masing senyawa sejumlah 112 dan 42 dan kelompok pembanding masing-masing 1 senyawa obat antitussif, 1 senyawa antihistamin, dan 1 senyawa obat bronkodilator dapat di cari dengan mengakses PDB, ligan yang di unduh harus kompleks. sedangkan untuk preparasi senyawa yang akan diuji dengan Autodock Vina membutuhkan data yang dapat diperoleh dengan mengakses PubChem dan Avogadro. Berikut adalah penjelasan langkah-langkahnya :

1. PubChem
 - a. Mencari SMILE dari senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang akan diuji dengan mengakses <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
 - b. Klik compound pada kolom Go, kemudian tulis nama senyawa (contoh: quercetine) yang akan dicari pada kolom Go.
 - c. Setelah hasil pencarian muncul, klik nama senyawa.
 - d. Klik download dan pilih penyimpanan bentuk 3D conformer.
2. Avogadro
 - a. Memasukan file yang telah diunduh pada PubChem ke avogadro *software*.
 - b. Setelah muncul struktur klik molekular mekanis lalu setup force dan ubah menjadi MMFF94 untuk mengubah menjadi energi minimize
 - c. Kemudian simpan struktur dalam bentuk pdbqt.
3. PDB
 - a. Mencari reseptor masing-masing obat golongan anti-inflamasi dan anti-hiperurisemia.
 - b. Buka website resmi PDB yaitu <https://www.rcsb.org>, kemudian tuliskan nama reseptor (contoh: Diphenhydramine) pada kolom Go, klik Go.
 - c. Setelah hasil pencarian muncul, klik Homo sapiens only pada kolom kiri Organism atau mencari spesies yang setara dengan mamalia.

- d. Lihat pada kolom Ligan , pastikan struktur ligand sesuai dengan senyawa obat.
- e. Klik download files pada pojok kanan atas welcome lalu pilih PDB format, kemudian save file.

4.5 2 Pemisahan Ligan dengan Reseptor

Makromolekul yang diunduh dari PDB berupa kompleks dengan ligan yang harus dipisahkan menggunakan Discovery Studio, dan harus dipisahkan dari residu-residu yang dapat mengganggu proses *docking* agar tidak mempengaruhi hasil. Pertama-tama akan dilakukan pemilihan ligan yang akan dilanjutkan dengan pemilihan protein (makromolekul), berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Pemilihan Ligan
 - a. Buka file PDB yang telah di unduh dengan Discovery Studio yang akan tampak gambar 3D.
 - b. Kemudian dalam view hierarcy akan dipilihnya unsur-unsur ligan yang tersedia.
 - c. Simpan ligan dengan cara klik Save as lalu beri nama ligan.
2. Pemilihan Makromolekul
 - a. Buka kembali file PDB yang telah di unduh dengan Discovery Studio yang akan tampak gambar 3D.
 - b. Kemudian dalam view hirarcy akan dipilihnya unsur-unsur makromolekul yang tersedia.
 - c. Simpan ligan dengan cara klik Save as lalu beri nama makromolekul atau protein.

4.5.3 Preparasi Makromolekul Dan Ligan

Sebelum dilakukan doking perlu dilakukan penyiapan senyawa obat dan protein yang terlibat lalu disimpan dengan format dan penyimpanan folder yang

telah ditentukan untuk mempermudah tahap selanjutnya. Berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Preparasi makromolekul
 - a. Membuka program Autodock Vina lalu masukan *file* protein atau makromolekul yang telah dipisahkan menggunakan Discovery Studio.
 - b. Mengedit *Startup Directory*, menyesuaikan dengan *directory* atau alamat folder kerja.
 - c. Kemudian mengklik *Read Molecule* lalu *Grid* dan *Select Molecule* untuk memilih protein yang akan disimpan.
 - d. Simpan protein dalam bentuk *pdbqt file* lalu tekan Save. Dengan demikian, preparasi makromolekul telah selesai.
2. Preparasi Ligan:
 - a. Masih dalam program Autodock Vina , pertama mengklik *file ligand* untuk menampilkan.
 - b. Simpan ligan dalam bentuk *pdbqt file* pada folder yang sama dengan sebelumnya. Mengklik *save as pdbqt*.
3. Membuat File Konfigurasi
 - a. Dilakukan pengaturan Grid box untuk menjangkau radius disekitar ligan dengan cara mengklik ligan lalu select ligan dan grid box kemudian save hasil rancangan grid box agar dapat terbaca untuk pembuatan file konfigurasi.
 - b. Kemudian membuka file konfigurasi pada folder kerja yang sudah tersimpan secara otomatis dengan nama file config.
 - c. Setelah itu ditambahkan exhaustiveness lalu menyimpan file tersebut.

4.5.4 Validasi Reseptor dan Obat

Tahap selanjutnya ditujukan untuk mengvalidasi kelompok pembanding (obat-reseptor atau protein) yang sebelumnya sudah dilakukan preparasi untuk melanjutkan langkah berikutnya mendocking senyawa metabolit dari tumbuhan.

1. Pada folder kerja akan dibuat *Open command window here* yang berisikan **script** mengenai lokasi instalasi software Autodock Vina dan scrip menjalankan *docking*, script perintahnya yaitu `–config conf.txt –log log.txt` (log.txt menunjukkan hasil *docking* yang nanti keluar sebagai file log).
2. Setelah ditekan *enter*, proses *docking* akan mulai berjalan tunggu hingga 100%
3. Jika proses sudah selesai, buka folder kerja, maka akan terdapat 2 file yaitu Log berisi hasil *docking* dan `pd_bqt_out` berisi konformasi ligand setelah *docking* yang terdapat 9 konformasi.
4. Untuk memisahkan ke-9 konformasi hasil *docking*, script perintahnya adalah `–input out.pd_bqt`
5. Setelah itu kembali lagi pada Discovery studio untuk melihat struktru kimia yang berupa hasil *docking* dengan cara memasukan file hasil *docking* dan ligan pada tahap awal yang dilakukan pemisahan dalam format `pd_bqt`.
6. Selain melihat perbandingan struktur selanjutnya dilakukan tahap akhir mengenai nilai RMSD dengan ketentuan jika terdapat interaksi ligan dan protein target maka nilai RMSD tidak melebihi 2.

4.5.5 Docking Ligan Senyawa Pembanding dan Senyawa Uji

Setelah memvalidasi metode docking tahap selanjutnya dilakukan docking senyawa metabolit sekunder tanaman yang akan diuji dengan reseptor obat antialergi serta docking senyawa pembanding dengan reseptor obat berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Membuka program AutoDock Vina yang telah disiapkan dengan reseptor dalam bentuk `pdb` kemudian diubah menjadi `pd_bqt`.
2. Dilakukan penentuan koordinat penambatan yang sama dengan koordinat (x,y,z) sebelumnya.
3. Lalu dimasukan ligan yang sudah dipreparasi dengan Avogadro dalam format `pdb` lalu diubah dalam bentuk `pd_bqt`.
4. Kemudian membuat file konfigurasi seperti tahap sebelumnya.

5. Setelah itu akan dilakukan proses docking senyawa tumbuhan dengan reseptor yang dipilih menggunakan metode yang sama pada tahap sebelumnya dengan replikasi sebanyak 3 kali.

4.5.6 Visualisasi Reseptor Obat dan Senyawa Tanaman

Visualisasi hasil *docking* dilakukan menggunakan aplikasi Discovery Studio dengan tujuan melihat interaksi ligan uji dengan reseptor target secara 2D dan 3D. Adapun parameter yang dilihat yaitu residu asam amino, jenis ikatan dan gugus farmakofor. Berikut langkah-langkahnya:

1. Dibuka aplikasi *Discovery Studio* kemudian dimasukkan reseptor dalam bentuk *pdqt*.
2. Dimasukkan ligan dalam bentuk *pdqt* di tab yang berbeda
3. Di copy ligan tersebut ke dalam tab reseptor
4. Dipilih ikon *define ligand* kemudian *Show 2D* dan akan terlihat jenis ikatan dan residu asam amino yang berikatan.
5. Ditekan ligan kemudian dipilih ikon *ligand interaction* untuk menampilkan interaksi antara ligan dan reseptor.

4.5.7 Uji Statistik ANOVA

Hasil *binding affinity* yang telah direplikasi sebanyak 3 kali kemudian diolah menggunakan SPSS dengan analisis *One Way ANOVA* ($p < 0,05$). Metode ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna nilai *binding affinity* antara ligan pembanding dengan ligan senyawa tanaman.